



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 100 62 890.7

Anmeldetag: 12. Dezember 2000

Anmelder/Inhaber: Eppendorf AG, Hamburg/DE

Bezeichnung: Labortemperiereinrichtung zur Temperierung
von Reaktionsproben

IPC: B 01 L, C 12 M, C 12 Q

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 12. Oktober 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Moß

Patentanwälte Schaefer & Emmel

European Patent Attorneys

Dipl. - Phys. Konrad Schaefer

Dipl. - Biol. Dr. Thomas Emmel

Tel: (0)-40-6562051 Fax: -6567919

Gehölzweg 20, D-22043 Hamburg

Commerzbank 22 / 58226 Blz 200 40 000

Postbank 225058 - 208 Blz 200 10 020

12. Dezember 2000

Uns. Zeichen: 02828

Eppendorf AG

Labortemperiereinrichtung zur Temperierung von Reaktionsproben

Die Erfindung betrifft eine Labortemperiereinrichtung der im Oberbegriff des Anspruch 1 genannten Art.

Derartige Labortemperiereinrichtungen werden zur zyklischen Temperierung von Reaktionsproben auf unterschiedliche Temperaturen verwendet, wie sie zur Durchführung einiger biochemischer Reaktionen erforderlich sind. Hauptanwendungsgebiet solcher Temperiereinrichtungen ist die PCR (Polymerase Chain Reaction). Wenn die optimalen Temperaturen der jeweiligen Temperaturbereiche bekannt sind, muß nur im Massendurchsatz eine möglichst große Zahl von Proben in einem Durchlauf mehrerer Zyklen verarbeitet werden. Unter "Durchlauf" wird im Folgenden ein abgeschlossener Reaktionsdurchlauf verstanden, bei dem die Schrittfolge mehrfach wiederholt wurde.

Die optimalen Temperaturen der einzelnen Temperaturbereiche müssen jedoch vorher ermittelt werden.

Gattungsgemäße Labortemperiereinrichtungen, wie sie z. B. aus US 6054263 und DE 196 46 115 A1 bekannt sind, bringen daher in einem Schritt der zyklisch wiederholten Schrittfolge alle Proben auf unterschiedliche Temperaturen innerhalb des zugeordneten Temperaturbereiches. Bei Auswertung des Reaktionsergebnisses kann ermittelt werden, bei welcher der Proben für diesen Schritt ein optimales Ergebnis vorliegt. Das ist dann die optimale Temperatur für diesen Schritt.

Bei handelsüblichen gattungsgemäßen Labortemperiereinrichtungen sind die Proben in einem flächigen Array zeilen- und spaltenweise angeordnet. Die Temperaturunterschiede werden als Gradient in einer Richtung über das Array angelegt. Die Schrittfolge wird zyklisch wiederholt. Bei diesen sogenannten Gradientencyclern wird bei jeder zyklisch wiederholten Schrittfolge immer nur bei demselben Schritt mit unterschiedlichen Temperaturen gearbeitet. Es kann also in einem Durchlauf nur die Temperatur für einen Schritt optimiert werden. Zur Optimierung der Temperaturen aller Schritte sind mehrere Durchläufe erforderlich. Dies ist mit erheblichen Zeitaufwand und Verbrauch an teuren Proben verbunden.

In der DE 196 46 115 A1 ist vorgeschlagen, bei jeder Schrittfolge in zwei Schritten Gradienten in X- bzw. Y-Richtung anzulegen. Damit können in einem Durchlauf zwei Schritte optimiert werden. Besteht die Schrittfolge jedoch aus mehr Schritten, z. B. den üblichen drei Schritten des Standard PCR-Prozesses, so müssen die weiteren Schritte in gesonderten Durchläufen optimiert werden. Außerdem ist zur Anlegung von Gradienten in unterschiedlichen Richtungen ein erhöhter Geräteaufwand und auch Auswertaufwand erforderlich.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, bei einer gattungsgemäßen Labortemperiereinrichtung die Temperaturoptimierung aller Schritte zu vereinfachen.

Diese Aufgabe wird mit den Merkmalen des Anspruches 1 gelöst.

Erfindungsgemäß sind die in der Labortemperaturiereinrichtung vorgesehenen Proben in jeweils einem der Schritte zugeordnete Teilmengen unterteilt. Bei jedem Schritt werden Temperaturunterschiede nur bei einer der Teilmengen angelegt, während alle übrigen Proben auf einer der Temperaturen des dem Schritt zugeordneten Temperaturbereiches liegen. Das Ganze wird zyklisch wiederholt. Greift man eine der Teilmengen heraus und betrachtet diese bei den aufeinanderfolgenden Schritten, so wird bei ihr mit Temperaturunterschieden nur in dem selben Schritt gearbeitet. Werden nach komplettem Durchlauf die Proben ausgewertet, so kann man an jeder der Teilmengen bei Auswertung des Resultates für die unterschiedlichen Gruppen die optimale Temperatur für einen der Schritte ermitteln. Diese Teilmenge bleibt von Temperaturunterschieden bei anderen Schritten unbeeinflusst. Es ergibt sich also eine sehr einfache und genaue Ermittlung der optimalen Temperatur für jeden Schritt. Bei einem Durchlauf können alle Schritte hinsichtlich ihrer Temperatur optimiert werden.

Die Proben können in beliebiger Weise zweidimensional oder dreidimensional oder auch willkürlich verteilt angeordnet sein. Die Gruppen- und Teilmengenzuordnung und -auswertung kann von einem Computer erledigt werden. Dabei ergibt sich der Vorteil, daß bei beliebiger Anzahl von Schritten pro Schrittfolge durch Unterteilung in eine entsprechend große Zahl von Teilmengen stets in einem Durchlauf die Temperaturoptimierung für alle Schritte erfolgen kann.

Nach der Lehre der DE 196 46 115 A1 wäre in einer zweidimensionalen Anordnung von Proben nur die gleichzeitige Optimierung zweier Schritte möglich. Bei einer dreidimensionalen Anordnung von Proben ergäbe sich analog die Möglichkeit zur Optimierung dreier Schritte in einem Durchlauf. Mit der vorliegenden

Erfindung wird die Zahl gleichzeitig optimierbarer Schritte unabhängig von der Dimensionszahl der Probenanordnung.

Vorteilhaft sind zur Vereinfachung der Anordnung und Auswertung der Proben die Merkmale des Anspruches 2 vorgehen, wobei insbesondere weiter vereinfachend die Merkmale der Ansprüche 3 und 4 vorgesehen sind. Dabei sind vorteilhaft die Teilmengen in übersichtlicher Weise gemäß Anspruch 5 angeordnet und es werden vorteilhaft Gradienten gemäß Anspruch 6 angelegt. Dies ergibt eine Anordnung, die im wesentlichen der des üblichen Gradientencyclers entspricht, bei der jedoch erfindungsgemäß Flächenbereiche des Arrays bei jedem Schritt anders behandelt werden. Dies kann bei Verwendung des üblichen wärmeleitfähigen Temperierblockes, der die Proben aufnimmt, z. B. durch entsprechende thermische Unterteilung an den Flächengrenzen ermöglicht werden.

Eine weitere Vereinfachung der Konstruktion und auch der Auswertung ergibt sich durch die vorteilhaften Merkmale des Anspruches 7.

In der Zeichnung ist die Erfindung beispielsweise und schematisch dargestellt. Es zeigen:

Fig. 1 Eine Labortemperiereinrichtung mit einer flächigen Anordnung von Proben bei Durchführung des ersten Schrittes einer dreischrittigen Schrittfolge,

Fig. 2 die Anordnung der Fig. 1 bei einem zweiten Schritt und

Fig. 3 die Anordnung der Fig. 1 bei einem dritten Schritt der Schrittfolge.

Fig. 1 zeigt eine Labortemperiereinrichtung 1, die in einer flächigen, nach Zeilen und Spalten geordneten Arrayanordnung Reaktionsproben 2 enthält. Im dargestellten Beispiel handelt es sich um Proben, an denen ein dreischrittiger PCR-Prozeß durchgeführt werden soll. Dabei werden alle Proben des Arrays in dem ersten Schritt, dem Denaturierungsschritt, auf Temperaturen im Temperaturbereich um 90° gebracht. Im zweiten Schritt, der in Fig. 2 dargestellt ist, dem Annealingschritt, werden alle Proben auf den Temperaturbereich um 45° gebracht. Im dritten Schritt, der in Fig. 3 dargestellt ist, dem Elongationsschritt, werden alle Proben auf einen Temperaturbereich um 65° gebracht.

Die Proben des in Fig. 1 dargestellten Arrays sind in drei Teilmengen entsprechend den dargestellten Flächenbereichen I, II, III unterteilt und zwar in der dargestellten einfachen Weise mit den beiden dargestellten Bereichsgrenzen, die parallel zu den Spalten des Arrays liegen.

In dem in Fig. 1 dargestellten Denaturierungsschritt bringt die Labortemperiereinrichtung 1 mit nicht dargestellten Temperiereinrichtungen die Flächenbereiche II und III auf die Mitteltemperatur von 90° des Temperaturbereiches. Im Flächenbereich I wird ein Temperaturgradient in Pfeilrichtung, also in Richtung der Spalten an diesen Bereich angelegt und erzeugt in diesem Temperaturen im Bereich 85° bis 95° .

In dem in Fig. 2 dargestellten zweiten Schritt, dem Annealingschritt, wird ein mit einem Pfeil dargestellter Gradient ebenfalls parallel zu den Spalten angelegt, jedoch im Flächenbereich II. Die Bereiche I und III liegen auf der Mitteltemperatur von 55° des zum Annealingschritt gehörenden Temperaturbereiches.

Bei dem in Fig. 3 dargestellten Elongationsschritt wird, wie dargestellt, ein Temperaturgradient im Bereich III angelegt. Die beiden Bereiche I und II liegen wie-

derum auf der Mitteltemperatur des zugehörigen Temperaturbereiches also auf 65°.

Die drei dargestellten Schritte werden als Schrittfolge zyklisch in einem Durchlauf wiederholt. In einer Schrittfolge wandert der Gradient von Schritt zu Schritt durch die Bereiche I-III.

Nach Ende des Durchlaufes werden die Reaktionsergebnisse in den Proben ausgewertet. Aus den Proben im Bereich I kann ermittelt werden, welche Temperatur für den Denaturierungsschritt optimal ist. Entsprechend kann aus den Proben der Bereiche II und III die optimale Temperatur für den Annealingschritt und den Elongationsschritt ermittelt werden. In einem Durchlauf können also alle drei Schritte hinsichtlich ihrer Temperatur optimiert werden.

Wird ein Prozeß verwendet, der nur zwei Schritte benötigt, so wären beispielsweise nur zwei Bereiche, also z.B. die Bereiche I und II, erforderlich. Wird ein Prozeß mit fünf Schritten verwendet, so wäre das Array in fünf Bereiche zu unterteilen, die in der aus den Figuren 1-3 ersichtlichen Weise zu behandeln sind.

Anders als im ausgeführten Ausführungsbeispiel, müssen die Gradienten nicht unbedingt in Spaltenrichtung anliegen. Sie können auch in Zeilenrichtung anliegen. Konstruktiv einfacher ist jedoch die dargestellte Ausführungsform, bei der die Gradienten parallel zu den Bereichsgrenzen III liegen, da die Gradienten von zwei Seiten der Arrayanordnung her (gemäß Fig. 1 von oben und von unten) für alle drei Bereiche I-III erzeugbar sind.

Ist die Labortemperiereinrichtung als üblicher wärmeleitfähiger Block mit Vertiefungen ausgebildet, in denen die Reaktionsproben 2 z. B. in Kunststoffgefäßen

angeordnet sind, so wäre an den Bereichsgrenzen für eine saubere thermische Trennung zwischen den Bereichen in geeigneter Weise Sorge zu tragen.

Werden die Reaktionsproben 2 mit nicht dargestellten Einrichtungen einzeln und unabhängig voneinander temperiert, so entfallen die Probleme an den Bereichsgrenzen. Es kann dann auch die Spalten- und Zeilenanordnung zugunsten einer beliebigen Anordnung der Reaktionsproben 2 in der Fläche des Arrays aufgegeben werden. Soll z. B. der Schritt gemäß Fig. 1 ausgeführt werden, so wird in einer beliebig aus den Proben 2 herausgegriffenen Teilmenge eine Anzahl von beliebig herausgegriffenen Gruppen gebildet und es werden diese Gruppen von Proben auf unterschiedliche Temperaturen gebracht, während alle übrigen Proben auf derselben Temperatur liegen.

Die innerhalb einer Teilmenge auf unterschiedliche Temperaturen gebrachten Gruppen müssen jeweils wenigstens eine Probe enthalten. In einfachster Ausführung könnte die in Fig. 1 dargestellte Arrayanordnung pro Flächenbereich (I, II, III) nur jeweils eine mit Proben besetzte Spalte enthalten. Dadurch wird der Probenverbrauch bei dem Temperaturoptimierungsdurchlauf verringert. Sind, wie dargestellt, mehrere Spalten pro Bereich vorgesehen, so kann diese Labortemperiereinrichtung später auch für die Massenverarbeitung großer Probenzahlen verwendet werden, bei der die optimalen Temperaturen der einzelnen Schritte bereits bekannt sind und daher in jedem in der in Figuren 1-3 dargestellten Schritte alle Proben auf der zuvor ermittelten Optimaltemperatur des Schrittes liegen.

Die vorerwähnten Ausführungsformen weisen eine zweidimensionale Arrayanordnung von Proben auf. Die Proben können nach der Erfindung auch dreidimensional, z. B. in einen rechtwinkligen Gitter geordnet oder auch unregelmäßig angeordnet sein. Die vorerwähnten Vorschriften gelten dann in analog auf Dreidimensionen erweiterter Form.

Patentanwälte Schaefer & Emmel

European Patent Attorneys

Dipl. - Phys. Konrad Schaefer

Dipl. - Biol. Dr. Thomas Emmel

Tel:(0)-40-6562051 Fax:-6567919

Gehölzweg 20, D-22043 Hamburg

Commerzbank 22 / 58226 Blz 200 40 000
Postbank 225058 - 208 Blz 200 10 020

12. Dezember 2000

Uns. Zeichen: **02828**

Eppendorf AG

Labortemperiereinrichtung zur Temperierung von Reaktionsproben

PATENTANSPRÜCHE

1. Labortemperiereinrichtung (1) zur gemeinsamen Temperierung von Reaktionsproben (2) in mindestens zwei Schritten (Fig. 1, 2, 3) in jeweils zugeordneten bestimmten Temperaturbereichen, welche als Schrittfolge wiederholt nacheinander ausgeführt werden, wobei die Labortemperiereinrichtung (1) in einem Schritt der Schrittfolge mehrere jeweils mindestens eine Probe enthaltende Gruppen (Zeilen) von Proben (2) auf innerhalb der Gruppen konstante und zwischen den Gruppen unterschiedliche Temperaturen innerhalb des Temperaturbereiches bringt, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Labortemperiereinrichtung (1) in jedem Schritt (Fig. 1, 2, 3) der Schrittfolge eine andere Teilmenge (I, II, III) der Proben (2) Gruppenweise (zeilenweise) auf innerhalb der Gruppen gleiche und zwischen den Gruppen unterschiedliche Temperaturen und die Proben der anderen Teilmengen auf eine gleiche Temperatur innerhalb des zugeordneten Temperaturbereiches bringt.

2. Labortemperiereinrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Proben (2) in einem flächigen Array in Zeilen und Spalten angeordnet sind.
3. Labortemperiereinrichtung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zeilen und Spalten orthogonal zueinander angeordnet sind.
4. Labortemperiereinrichtung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß alle Proben einer Gruppe in einer Zeile oder in einer Spalte liegen.
5. Labortemperiereinrichtung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Teilmengen zusammenhängenden Flächenbereiche (I, II, III) des Arrays entsprechen.
6. Labortemperiereinrichtung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Temperaturunterschiede als Temperaturgradient (Pfeil) parallel zu den Zeilen oder Spalten des Arrays ausgebildet sind.
7. Labortemperiereinrichtung nach den Ansprüchen 3 und 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Grenzen der Flächenbereiche (I, II, III) parallel zur Richtung des Gradienten (Pfeil) liegen.

Patentanwälte Schaefer & Emmel

European Patent Attorneys

Dipl. - Phys. Konrad Schaefer

Dipl. - Biol. Dr. Thomas Emmel

Tel: (0)-40-6562051 Fax: -6567919

Gehölsweg 20, D-22043 Hamburg

Commerzbank 22 / 58226 Blz 200 40 000

Postbank 225058 - 208 Blz 200 10 020

12. Dezember 2000

Uns. Zeichen: 02828

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Labortemperiereinrichtung zur gemeinsamen Temperierung von Reaktionsproben in mindestens zwei Schritten in jeweils zugeordneten bestimmten Temperaturbereichen, welche als Schrittfolge wiederholt nacheinander ausgeführt werden, wobei die Labortemperiereinrichtung in einem Schritt der Schrittfolge mehrere jeweils mindestens eine Probe enthaltende Gruppen von Proben auf innerhalb der Gruppen konstante und zwischen den Gruppen unterschiedliche Temperaturen innerhalb des Temperaturbereiches bringt, ist dadurch gekennzeichnet, daß die Labortemperiereinrichtung in jedem Schritt der Schrittfolge eine andere Teilmenge der Proben Gruppenweise auf innerhalb der Gruppen gleiche und zwischen den Gruppen unterschiedliche Temperaturen und die Proben der anderen Teilmengen auf eine gleiche Temperatur innerhalb des zugeordneten Temperaturbereiches bringt.

Fig. 1

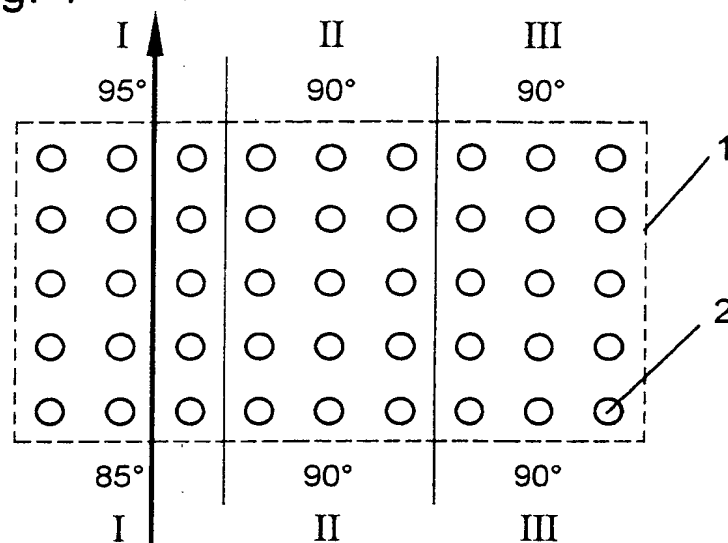


Fig. 2

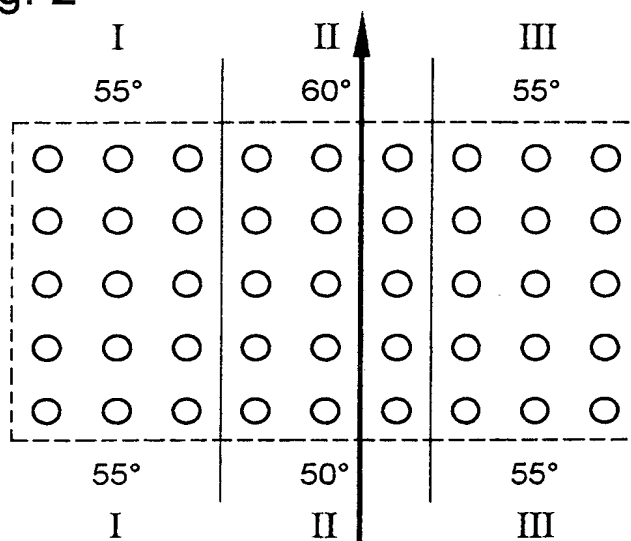


Fig. 3

